[農化 第 47 卷, 第 5 号, p. 347~351, 1973]

B. cereus の孢子および栄養細胞に含まれる タンパク質のマクロレベルにおける比較

高橋裕喜, 鈴木絃一, 今堀和友
(東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 47 年 10 月 14 日 受 理

Preliminary Comparison of the Proteins from Spores and Vegetative Cells of *Bacillus cereus* [Note]

By Hiroki TAKAHASHI, Koichi SUZUKI and Kazutomo IMAHORI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo

The N-terminal amino acid of S-100 (soluble fraction) and ribosomal proteins from spores of *B. cereus* were mainly Ala, Ser (Met), and Thr. The results were very similar to those obtained with corresponding samples from vegetative cells and with the results reported for proteins from *E. coli*. The average molecular weight of spore S-100 proteins (31,000) was also about the same as that of vegetative cell proteins (25,000). These facts presumably suggest that the proteins in spores are synthesized by the ordinary mechanisms of protein synthesis. Amino acid analyses revealed that spore S-100 proteins were more acidic and spore ribosomal proteins were perhaps rather more basic than the corresponding proteins from vegetative cells and from *E. coli*.

During the course of amino acid analyses of spore S-100 proteins one unusual peak (X) was found at a position between peaks for methionine and isoleucine. The substance X, presumably amino acid, was detected exclusively in spore S-100 proteins and appears to be contained in proteins or other high molecular weight substances. It will be of interest to investigate the mode of binding of X to high molecular weight substances, and biosynthetic route by which it is incorporated into them.

(Received October 14, 1972)

Bacillus 属の細菌の形成する孢子は細胞分化, 細胞の休眠等の機構を単細胞レベルで取り扱えるので, 古くから主として細胞学的なレベルで研究されてきた⁽¹⁾. 最近栄養細胞と孢子とから種々の酵素を抽出精製し, 両者の性質を比較検討することにより, 分子レベルでの孢子タンパク質の研究が始められた⁽²⁾. 現在までに得られた知見によると, 孢子から得られる酵素は栄養細胞の酵素と全く変わらないと思われるもの, 全く異なっていると考えられるもの, および栄養細胞の酵素に孢子形成初期に産出されるプロテアーゼが作用して生じる活性断片と思われるものの3つの型が存在する^(3,4).

われわれは, 細胞の分化や休眠の機構を明らかにする第一歩として, 孢子および栄養細胞の無細胞抽出液を, 遠心により沈でんさせたりボソーム区分と上澄の S-100 区分とに分け, それらに含まれるタンパク質について, N末端アミノ酸, 分子量, アミノ酸組成を比較し, 以下の事項を検討した. (1) 孢子は耐熱性であるだけでなく, 種々の処理に対してきわめて安定であるが⁽¹⁾, この原因が孢子の膜や水分含量だけでなく, 孢子タンパク質にも起因するとすれば, 孢子タンパク質には栄養細胞のタンパク質に比べ, なにか特徴はないか. (2) 孢子のタンパク質は栄養細胞のものと同様, 通常のタンパク質合

成の方式⁽⁴⁾に従い, フォルミルメチオニンから合成されているのか否か。(3) 上述の栄養細胞型の酵素にプロテアーゼが作用し, 孢子型の酵素ができる様式⁽⁹⁾は, どの程度の範囲にまで適用しうるのか。

Bacillus cereus T 株を G 培地⁽⁶⁾で振盪培養した。栄養細胞は対数初期で集菌し, 緩衝液 (50 mM トリス, 10 mM 塩化マグネシウム, pH 7.5) で 2 回洗浄し, -20°C に凍結保存した。孢子は約 48 時間培養後集菌し, 同じ緩衝液で 5 回洗浄後, SDS 処理⁽⁶⁾をおこなってから, 食塩水および緩衝液で充分洗浄し, 凍結保存した。得られた孢子区分は, 顕微鏡下で遊離孢子のみで栄養細胞は全く見出されなかった。

孢子または栄養細胞を 2 倍量のガラスビーズ (直径 100 μ), 2 倍量の緩衝液とともに氷冷下でワーリングブレンダーにより磨砕 (孢子は合計 30 分, 栄養細胞は合計 20 分) した。抽出液を 20,000 $\times g$ で 20 分遠心し, ガラスビーズ, 菌体等を除き, 上澄を 75,000 $\times g$ で 4 時間遠心した。上澄の上から約 2/3 をとり低速遠心, 高速遠心をもう 1 回繰り返す, 最後的高速遠心の上澄の上から約 4/5 をとり, 10 mM トリス, 5 mM 塩化マグネシウム, pH 7.5 に 1 晩透析後, 凍結乾燥し, S-100 区分とした。第 1 回的高速遠心の沈でんは緩衝液に懸濁し, 低速遠心, 高速遠心を繰り返す, リボソーム区分を沈でんとして集めた。リボソームタンパク質は, リボソームから酢酸法⁽⁷⁾で抽出し, 蒸留水に対し透析後, 凍結乾燥した。対照に用いた大腸菌の試料は, A-19 株より同様な方法で調製した。Table III に示したごとく, 大腸菌の S-100 とリボソームタンパク質のアミノ酸組成は, 文献⁽¹⁰⁾と良く一致しているので, *B. cereus* の場合にも調製の際のリボソームの分解や, リボソームタンパク質の離脱は少ないものと考えられる。

タンパク質の N 末端アミノ酸分析は, DNP 法により行なった⁽⁸⁾。すなわち, タンパク質を 8 M 尿素, 0.2 M 炭酸緩衝液, pH 9.0 中で過剰の 2,4-ジニトロフロロベンゼンと攪拌しながら 40°C , 4 時間反応させた。反応液を酢酸エチルで処理し, 過剰の試薬, ジニトロフェノール等を除いた後, 塩酸を加えて酸性にし, 沈でんした DNP-タンパク質を希塩酸, アルコール, エーテルで洗い乾燥保存した。DNP-タンパク質を封管中 6 N 塩酸, 110°C , 12 時間加水分解し, 加水分解液を水で希釈後 (約 1 N とする) 酢酸エチルで抽出して, 有機溶媒に可溶な DNP-アミノ酸と, 水溶性の DNP-アミノ酸とに分別し

た。有機層, 水層はともに濃縮後, ペーパークロマトグラフィーの試料とした。有機層の DNP-アミノ酸は, 2 次元のペーパークロマトグラフィー (1 次元: 0.1% アンモニア飽和 *n*-ブタノール, 2 次元: 1.5 M リン酸緩衝液, pH 6.0) で分離し, 1% 重炭酸ナトリウムで各スポットを抽出し, 350 m μ で比色定量した。水層の DNP-アミノ酸は, 1 次元のペーパークロマトグラフィー (*n*-ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:5 (v/v) の上層) で分離した。

アミノ酸組成は, タンパク質を 6 N 塩酸, 110°C , 24 時間加水分解し, 日立 KLA-3 B 自動アミノ酸分析機で分析した。

分子量は SDS-ディスクゲル電気泳動⁽⁹⁾により求めた。すなわち, コマジーブルーで染色したゲルを, ギルフォード分光光度計でトレースし, 各バンドの染色濃度からタンパク質量を求め, 各バンドの移動度より分子量を算出し, これらの値から平均分子量を計算した。

孢子および栄養細胞のリボソーム, S-100 タンパク質の N-末端アミノ酸の分析結果を, すでに報告されている大腸菌⁽¹⁰⁾, 枯草菌⁽¹¹⁾の結果と合せて, Table I に示した。大腸菌の場合はメチオニン, アラニン, セリン, トレオニンの 4 種のアミノ酸が, 全体の N 末端アミノ酸の約 90% を占めている。ここで得られた, *B. cereus* の栄養細胞の結果も, 大腸菌の場合と良く似ていて, 同じ 4 種類のアミノ酸で N 末端のアミノ酸をほとんど完全に説明できる。これに対し枯草菌の場合は, アラニンが非常に多い特徴があるが, N 末端のアミノ酸の分布はランダムではなく, アラニン, メチオニン, セリン, トレオニン等の限られた種類のアミノ酸のみが検出されていて, そのアミノ酸の種類は, 他の場合と同一である。このように, ごく限られた比較的少数のアミノ酸しか N 末端に見出されないことは, フォルミルメチオニンから開始されたタンパク質合成が, 合成終了後に脱フォルミル化され, またはプロテアーゼで特異的に切断され, 主としてメチオニン, アラニン, セリンおよびトレオニンを N 末端に持つタンパク質を生じた結果と考えられている^(4,12)。*B. cereus* の場合, タンパク質合成の機構はほとんど明らかにされていないが, N 末端分析の結果から考えると, おそらく大腸菌と同じ機構で行なわれているものと推定される。*B. cereus* の栄養細胞の S-100 とリボソームタンパク質の N 末端は, 大腸菌に比べセリンとトレオニンが多く, メチオニンが比較的少ないことが特

Table I. N-Terminal Amino Acid Analyses of Proteins in Ribosomal and S-100 Fractions of Spores and Vegetative Cells of *B. cereus*¹⁾

	Ribosomal protein					S-100 Protein				
	<i>B. cereus</i>		<i>B. subtilis</i> ²⁾		<i>E. coli</i> ³⁾	<i>B. cereus</i>		<i>B. subtilis</i> ²⁾		<i>E. coli</i> ³⁾
	Vegetative cells	Spores	Vegetative cells	Spores		Vegetative cells	Spores	Vegetative cells	Spores	
Ala	38	44 ⁴⁾	88	90	38	14	38	78	80	19
Met	11	—	2.5	—	48	17	—	9	3	31
Ser ⁵⁾	41	44	5	—	8	61	62	5	8	36
Thr					4	8				9.5
Asp, Glu	5	—	5	—	2	—	±	4	5	2.5
Lys	5	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Others	—	—	—	—	—	—	—	3	—	1

¹⁾ Results are expressed as mole % of amino acid found by the DNP-method. ²⁾ Values from reference (11). ³⁾ Values from reference (10). ⁴⁾ Due to the limited amount of the sample only qualitative analyses were performed. ⁵⁾ Values for Ser and Thr include variable amounts of methionine sulfoxide which is derived from methionine during acid hydrolysis.

微である。個々の細菌で見られる N-末端アミノ酸の差は、タンパク質の合成機構の差ではなく、タンパク質の量的、質的な差に起因するものと思われる。

B. cereus の孢子の S-100 およびリボソームタンパク質の N 末端アミノ酸の分布は、栄養細胞の場合とはほとんど同じで、ただ孢子の場合にメチオニンが検出されなかった点が異なっている。これは、事実メチオニンがほとんどないのか、または共存物質の影響で孢子の場合、特にメチオニンの酸化が著しく、メチオニンスルホンとなり、セリンのスポットとして検出されたのかのいずれかであろう。しかし、いずれにせよ孢子のタンパク質の場合にもアラニン、セリン、トレオニン、(メチオニン)の 3, 4 種のアミノ酸しか、N 末端アミノ酸として見出せなかったことは、孢子中のタンパク質も、大腸菌や栄養細胞の場合と同様なタンパク質合成機構により、合成されていることを示唆している。もし栄養細胞型のタンパク質が、孢子形成初期に産生される基質特異性の低いプロテアーゼ⁽¹³⁾で分解されて、孢子型のタンパク質に変換する機構⁽⁴⁾が、かなり一般的に広く行なわれているとすれば、孢子タンパク質の N 末端アミノ酸の分布は、かなりランダムになるはずで、上記以外のアミノ酸も検出されてしかるべきである。しかしながら、アラニン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸しか見出されなかったのも、プロテアーゼによる栄養細胞型タンパク質の孢子型タンパク質への変換は、特殊な場合^(9,14)に限られ、一般的ではないと考えられる。以上の結果は、Table II に示した S-100 タンパク質の分子量測定結果からも推定される。もし、プロテアーゼによる

Table II. Average Molecular Weight of Proteins in S-100 and Ribosomal Fractions Determined by SDS Disc Gel Electrophoresis

	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i> ¹⁾
	Vegetative cells	Spores	
Ribosomal protein	15,000	24,000	25,000
S-100 Protein	25,000	31,000	50,000

¹⁾ Values from reference (10).

孢子型タンパク質の生成が、かなり一般的なものであれば孢子の S-100 タンパク質の分子量は、栄養細胞のそれよりも小さくなるはずである。孢子 S-100 タンパク質の分子量は 31,000 と算定され、栄養細胞の S-100 タンパク質の分子量 (25,000) と、ほぼ同じであった。これらの分子量は、大腸菌で報告されている値 (50,000)⁽¹⁰⁾よりはやや小さいが、この値は末端法 (DNP 法) により算定されたもので、実際より高い値と考えられる。そのため、栄養細胞や孢子で得られた値と、大腸菌の値とを直接比較できないが、孢子のタンパク質が栄養細胞のものに比べ、分子量が特に小さいという事実は見出せなかった。この事実は、孢子のタンパク質が栄養細胞のタンパク質と、おそらくは同じ機作で合成されていることを間接的に示唆するだけでなく、孢子のタンパク質自体に耐熱性があるとしても、その原因は少なくとも、分子量が小さいためではないことを示している。

われわれは、さらに孢子タンパク質の特徴を探索するために、S-100 とリボソームタンパク質のアミノ酸組成を検討した (Table III)。孢子 S-100 タンパク質のアミ

Table III. Amino Acid Composition of Proteins in S-100 and Ribosomal Fractions of Spores and Vegetative Cells of *B. cereus*¹⁾

	Ribosomal protein			S-100 Protein		
	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>
	Vegetative cells	Spores		Vegetative cells	Spores	
Lys	7.02	9.96	8.29	6.02	3.43	6.22
His	1.29	1.96	2.32	1.65	0.65	2.13
Arg	5.76	7.38	8.03	3.71	1.92	4.53
Asp	9.73	9.34	8.37	8.90	6.04	10.94
Thr	5.67	4.72	5.15	4.54	4.93	5.87
Ser	5.22	4.80	4.28	3.75	4.30	4.22
Glu	10.66	9.79	10.67	16.01	17.55	11.26
Pro	5.57	3.83	4.22	4.66	2.95	4.46
Gly	8.79	6.14	8.15	9.87	10.26	9.84
Ala	11.47	9.52	12.05	10.52	18.04	10.47
Cys/2	trace	trace	+	+	trace	+
Val	9.57	7.03	8.67	9.13	9.59	7.90
Met	2.32	2.94	2.20	2.43	0.97	2.51
Ile	5.73	5.96	5.31	5.17	2.97	5.73
Leu	6.09	9.88	7.59	7.00	5.11	8.36
Tyr	2.06	2.85	1.68	2.55	4.32	2.51
Phe	3.06	3.91	3.02	4.15	2.50	3.02
X	—	—	—	+	4.46 ²⁾	—
Glucosamine	—	—	—	—	卅	—
A/B ³⁾	1.59	1.10	1.17	2.57	4.41	2.07

¹⁾ Values are expressed as mole % of amino acid. ²⁾ The amount was calculated using the constant for isoleucine. The value is omitted from the calculation of mole % of each amino acid. ³⁾ Acidic amino acids (Glu+Asp)/basic amino acids (Arg+Lys).

ノ酸組成自体には、これといった特徴は見出せなかったが、栄養細胞や大腸菌の S-100 タンパク質と比較すると、次のような差異が見出された。すなわち Table III 中の A/B 値は、タンパク質の酸性の度合を示す 1 つの尺度であるが、胞子の S-100 タンパク質はこの値が 4.4 で、他の場合に比べ非常に高く、酸性タンパク質であることが示される。この事実、今まで分析された耐熱性酵素の多くが、非耐熱性酵素に比べて、酸性（および疎水性）アミノ酸に富む¹⁵⁾ことを考えると胞子の耐熱性を考えるうえで、興味あることかもしれない。また、胞子の S-100 タンパク質には、グルタミン酸とアラニンが多く見出される。胞子中には遊離のアラニン、グルタミン酸のブールの存在が知られているが¹⁶⁾、これらのアミノ酸は遊離アミノ酸としてだけでなく、タンパク質中にも他のアミノ酸より多く存在している。

一方リボソームタンパク質は、いずれの場合も S-100 タンパク質より平均的に塩基性である。胞子のリボソームタンパク質は、S-100 区分とは反対に、3 者の中でも塩基性である。それゆえ、ここで観察された胞子と栄

養細胞の S-100 およびリボソーム区分のアミノ酸組成の差は、相互の区分が混入したためでないことは明らかである。小林¹⁷⁾も胞子のリボソームタンパク質は、栄養細胞のリボソームタンパク質とは、明らかに異なっていることを報告しているが、ここで観察された事実は、それを支持するものである。

胞子 S-100 タンパク質の分析の際に通常見出されるアミノ酸のピーク以外に、グルコサミン、レブリン酸およびバリンとイソロイシンの中間に相当する位置にピークが検出された。前二者は、胞子タンパク質中にグルコサミン、グルコース（加水分解の際にレブリン酸に変化する¹⁸⁾）等を含んだ糖タンパク質の存在を示唆している。後者（仮に X とする）については、相当するピークを取り出し、完全な同定を行なうまでにはいたっていないが、標準のアロイソロイシンと試料とを混合すると、X はアロイソロイシンのすぐ前に溶出されるので、X はイソロイシンが加水分解中に異性化をおこしたアロイソロイシンではない。ピーク X は 570 mμ, 640 mμ, 440 mμ の発色の比率からすると、通常のアミノ酸に近く、おそ

らくケト酸ではなくアミノ酸と考えられる。Xは Table III にも示したように、量的にイソロイシンとほぼ同じくらい存在し、かなり多い。アミノ酸分析の試料は、S-100 タンパク質を透析後加水分解したもので、X はおそらくタンパク質またはこの区分に含まれる他の高分子物質に取り込まれた形で孢子中に存在すると思われる。一方 X は栄養細胞の S-100 区分、孢子および栄養細胞のリボソーム区分には、ほとんど全く存在しないので、X は孢子の S-100 区分に、特異的に存在しているものと考えられる。

この X に関しては、生合成、孢子の S-100 区分に特異的に存在する生理的意義、高分子物質への取り込まれ方等の興味ある問題が生じてくる。現在 X の完全な同定、高分子物質中での存在様式等の点に関し実験を進めているが、これらの結果ならびに孢子と栄養細胞に含まれるタンパク質の詳細な分析等に関しては、別に報告する予定である。

- (1) P. C. Fitz-James and I. E. Young: "The Bacterial Spore," ed. by G. W. Gould and A. Hurst, Academic Press Inc., N. Y., 1969, p. 39.
- (2) A. Kornberg, J. A. Spudich, D. L. Nelson and M. P. Deutscher: *An. Rev. Biochem.*, **37**, 51 (1968).
- (3) H. L. Sadoff, E. Celikkol and H. L. Engelbrecht: *J. Bact.*, **98**, 1208 (1969).
- (4) F. Lipman: *Science*, **164**, 1024 (1969).
- (5) T. Hashimoto, S. H. Black and P. Gerhardt: *Can. J. Microbiol.*, **6**, 203 (1960).
- (6) P. Chambon, E. J. Dupraw and A. Kornberg: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5101 (1968).
- (7) J.-P. Waller and J. I. Harris: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **47**, 18 (1961).
- (8) 岩井浩一, 藤岡英子: 蛋白質 核酸 酵素, **8**, 5 (1963).
- (9) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- (10) J.-P. Waller: *J. Mol. Biol.*, **7**, 483 (1963).
- (11) K. Horikoshi and R. H. Doi: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2381 (1968).
- (12) D. Wigle and G. H. Dixon: *Nature*, **227**, 676 (1970).
- (13) H. Matsubara and J. Feder: "The Enzymes," Vol. III, ed. by P. D. Boyer, Academic Press Inc., N. Y., 1971, p. 721.
- (14) R. H. Doi: 蛋白質 核酸 酵素, **17**, 370 (1972).
- (15) K. Suzuki and J. I. Harris: *Eur. J. Biochem.*, 投稿中.
- (16) R. W. Bernlohr: *J. Bact.*, **93**, 1031 (1967).
- (17) 小林泰夫: 化学と生物, **10**, 86 (1972).
- (18) The Merck Index, 7 版, p. 907 参照.